

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Translation

WO97/18703

PCT/JP96/03375

What is claimed is:

1. A method for constructing transgenic animals by infecting a fertilized animal egg for which the egg membrane has been eliminated with a non-productive recombinant adenovirus having a foreign gene introduced therein and then transplanting the embryo into the uterus of a host.
2. The method for constructing transgenic animals according to Claim 1, wherein said foreign gene is a nucleotide having a base sequence encoding physiologically active protein, antibody, coloring protein as a marker gene, or drug-resistant protein as a marker gene.
3. The method for constructing transgenic animals according to Claims 1 or 2, wherein dosage used for infecting a fertilized animal egg for which the egg membrane has been eliminated with a non-productive recombinant adenovirus is $5 \times 10^4 \sim 10^8$ p f u / ml.
4. The method for constructing transgenic animals according to Claims 1, 2, or 3, wherein the non-productive adenovirus expresses under the control of CAG promoter.
5. The method for constructing transgenic animals according to Claims 1, 2, 3 or 4, wherein the non-productive adenovirus comprises nuclear transmutating signals.
6. The method for constructing transgenic animals according to Claims 1, 2, 3, 4 or 5, wherein only one copy of a non-productive recombinant adenovirus having a foreign gene introduced therein is integrated into a genome of a fertilized animal egg.
7. Transgenic animals constructed by infecting a fertilized animal egg for which the egg membrane has been eliminated with a non-productive recombinant adenovirus having a foreign gene introduced therein and then transplanting the embryo into the uterus of a host.



<p>(51) 国際特許分類6 A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/18703</p> <p>(43) 国際公開日 1997年5月29日(29.05.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03375</p> <p>(22) 国際出願日 1996年11月18日(18.11.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/326533 1995年11月20日(20.11.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 豊田 裕(Toyoda, Yutaka)[JP/JP] 〒080 北海道帯広市大空町12丁目4番地 大空住宅302-301 Hokkaido, (JP) 斎藤 泉(Saito, Izumu)[JP/JP] 〒151 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING TRANSGENIC ANIMALS</p> <p>(54) 発明の名称 トランスジェニック動物の作成方法</p> <p>(57) Abstract A method for conveniently and efficiently constructing transgenic animals comprising infecting a fertilized animal egg for which the egg membrane has been eliminated with a non productive recombinant Adenovirus having a foreign gene introduced thereinto and then transplanting the embryo into the uterus of a host.</p> <div data-bbox="834 1255 1386 1885"> </div>		

(57) 要約

外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させた後、この胚を借り親動物の子宮に移植することによって簡便かつ効率的にトランスジェニック動物を作成することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	RD	ロンドン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア共和国
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	UA	ウクライナ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CF	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CM	コモロ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

トランスジェニック動物の作成方法

5 技術分野

本発明は非増殖型組換えアデノウイルスを用いて外来遺伝子をゲノム内に導入して得られるトランスジェニック動物、および該トランスジェニック動物の作成方法に関するものである。

背景技術

- 10 トランスジェニック動物の作成は、従来より困難であり、目的とするトランスジェニック動物の作成が可能な施設は極めて限られているのが現状である。

従って、トランスジェニック動物の簡便かつ効率的な作成方法の開発が強く望まれている。

- 一方、本発明者らは、非増殖（E1A欠損）型の組換えアデノウイルスが宿主
15 ゲノム中にほとんど組み込まれないこと（Rosenfeld et al., Science 252, 431-434（1991））から、遺伝子制御の研究や体細胞遺伝子治療の開発のための遺伝子発現に利用されてきた（Akli et al., Nat. Genet. 3, 224-228（1993））ことに着目して種々研究を重ね、LacZ遺伝子を含む非増殖型アデノウイルスが、前核期の無卵膜マウス卵子に感染することが可能であり、悪影響なしに卵割期の
20 着床前胚において発現することを明らかにした（Tsukui et al., J. Mamm. Ova. Res., 10(1),（1993, 4）150-151）。

しかし、この方法によっても発現は一過性であり、安定なトランスジェニック動物を作成することには成功していなかった（Tsukui et al., Mol. Reprod. Dev. 42, 291-297（1995））。

- 25 従って、本発明の第1の目的は、外来遺伝子をゲノムに導入されたトランスジェニック動物の簡便かつ効率的な作成方法を提供することにある。さらに本発明の第2の目的は、本発明の方法によって作成されたトランスジェニック動物を提供することにある。

発明の開示

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、非増殖型組換えアデノウイルスが動物の卵子のゲノム中に組み込まれ、そして組み込まれた該アデノウイルスDNAが動物の生殖細胞系に移行すること、すなわち非増殖型組換えアデノウイルスを用いることによりトランスジェニック動物を作成し得ることを
5 発見した。本発明はかかる発見に基づきさらに研究を重ねて完成するに至ったものである。

即ち、本発明の要旨は、

- (1) 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させた後、この胚を借り親動物の子宮に移植することを特徴とするトランスジェニック動物の作成方法、
10
- (2) 外来遺伝子が、生理活性タンパク、抗体、マーカー遺伝子としての発色タンパクまたはマーカー遺伝子としての薬剤耐性タンパクをコードする塩基配列を有するヌクレオチドである前記(1)記載のトランスジェニック動物の作成方法、
- 15 (3) 非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させる場合の投与量が $5 \times 10^7 \sim 10^8$ pfu/mlであることを特徴とする前記(1)または(2)記載のトランスジェニック動物の作成方法、
- (4) 非増殖型組換えアデノウイルスが、CAGプロモーター支配下に発現するものである前記(1)～(3)いずれかに記載のトランスジェニック動物の作
20 成方法、
- (5) 非増殖型組換えアデノウイルスが、核移行シグナルを含むものである前記(1)～(4)いずれかに記載のトランスジェニック動物の作成方法、
- (6) 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスの1コピーだけが動物受精卵のゲノムに組み込まれることを特徴とする前記(1)～(5)いずれ
25 かに記載のトランスジェニック動物の作成方法、並びに
- (7) 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させた後、この胚を借り親動物の子宮に移植することによって作成されたトランスジェニック動物、
に関する。

図面の簡単な説明

図1は、非増殖型アデノウイルスDNAの組み込みのサザン分析による同定を示す電気泳動の写真である。27匹の動物の尾から単離されたゲノムDNAをEcoRVおよびHindIIIで消化し、AxCANLacZ配列と98%の相同性を有するpAxCANLacZのコスミドDNAをプローブとして用いた。aはEcoRV消化、bはHindIII消化のデータである。白丸は、アデノウイルスの末端断片である。星印は組み込み事象後のウイルスー細胞DNAの連結断片を示す。

図2は、3匹のトランスジェニックマウスゲノムに組み込まれたアデノウイルスDNAを示す。太線は組換えアデノウイルスAxCANLacZの制限酵素地図を示す。

図3は、F1子孫への生殖細胞系の遺伝およびF1上でのアデノウイルストランスジェニックの発現を示す電気泳動の写真である。LacZ発現性のトランスジェニックマウス(ACL9.23)をICR雌と交配させ、発生した10匹のF1胎仔を妊娠後13.5日に試験に供した。その10個の胎盤から単離されたゲノムDNAを図1に示すものと同様の手順によりサザン分析に付した。レーン1、3、4、7、8および10はアデノウイルストランスジェニックの伝達があったことを示し、レーン2、5、6および9は、かかる伝達がなかったことを示す。星印は組み込み事象後のウイルスー細胞DNAの連結断片を示す。

20 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明について詳細に説明する。

本発明に用いられる非増殖型アデノウイルスは、鐘ヶ江 裕美、原田 志津子および斎藤 泉「実験医学別冊」バイオマニュアルシリーズ4「遺伝子導入と発現・解析法」43～58頁「アデノウイルスを用いた遺伝子導入」1994年に記載の方法によって調製することができ、また外来遺伝子を導入した非増殖型アデノウイルスを調製することができる。

本発明に用いられる非増殖型アデノウイルスは、幾つかの特徴を有する。すなわち、アデノウイルスは、第1に宿主の範囲がきわめて広く、第2に組み換え遺伝子を非分裂細胞中に導入させることが可能である。

非増殖型組換えアデノウイルスは、かかる性質を有することから、前核期における動物受精卵に対するベクターとして期待される。しかしながら、本発明者らの研究では、非増殖型アデノウイルスベクターの1種であるSR α プロモーターの制御下にある大腸菌LacZ遺伝子を含むAdex4SRLacZLを使用して前核期における動物受精卵に対する遺伝子導入を試みたが、感染卵子から発育した13.5日胎仔において発現を検出することができなかった (Tsukui, T., et al. Mol. Reprod. Dev. 42, 291-297 (1995))。

本発明においては、動物細胞に感染した後、外来遺伝子の発現を可能とするため、アデノウイルスベクターにプロモーターを導入する必要があるが、かかるプロモーターとしては従来アデノウイルスを用いる遺伝子導入に使用されてきたものはいずれも使用可能であり、特にCAGプロモーター (Araki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 160-164 (1995)) が好適に用いられる。

本発明において、外来遺伝子の発現産物が細胞質に蓄積されることによる毒性が懸念される場合は、外来遺伝子とともに核移行シグナル配列を組み込んでもよい。核移行シグナル配列はアデノウイルスベクターにより感染細胞の核内で発現され核外に分泌された外来遺伝子産物が再び核内に移行することを促進する (Daniel Kalderon et al., Cell 39, 499-509 (1984))。

本発明者らは、ウイルス組み込みの結果を明確にするために、以下には1例として、新たなベクターであるAxCANLacZを用いる。このAxCANLacZは、外来遺伝子(LacZ)により発現する β -ガラクトシダーゼ(β -gal)活性の同定のために、トランスジェニックマウスで普遍的発現に用いられるCAGプロモーターの支配下にある核標的化されたLacZ遺伝子を含む。このベクターの調製は以下のようにして行うことができる。例えば、Kanegae らの方法 (Kanegae, Y. et al., Nucleic Acids Research, 1995, vol. 23, 3816-3821) により、アデノウイルスの複製に必要なE1A蛋白質を産生させず、外来遺伝子を発現するように設計し、また細胞および組織での発現を確認できるように、CAGプロモーターの支配下に大腸菌由来のLacZ遺伝子を挿入することにより調製できる。

本発明に用いられる外来遺伝子としては、特に限定されるものではなく、その

- 有用性の観点から、生理活性タンパク、抗体、マーカー遺伝子としての発色タンパク、マーカー遺伝子としての薬剤耐性タンパク等をコードする塩基配列を有するヌクレオチドが挙げられる。生理活性タンパクとしては、サイトカイン類（例えば、インターロイキン-1～15、インターフェロン- α 、 β もしくは γ 、腫瘍壊死因子- α もしくは β 、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン、成長ホルモン、インシュリン、インシュリン様成長ホルモン等）、神経栄養因子類、 α -1アンチトリプシン、血液凝固第8因子、血液凝固第9因子、 α -ガラクトシダーゼ等が挙げられる。マーカー遺伝子としての発色タンパクとしては、 β -ガラクトシダーゼ、GFP (Green fluorescent protein)等が挙げられる。マーカー遺伝子としての薬剤耐性タンパクとしては、アミノグリコシドフォスホトランスフェラーゼ等が挙げられる。

- 本発明のトランスジェニック動物を作成する方法は、以下のようにして行うことができる。本発明において、トランスジェニック動物とは、生殖系に導入された外来遺伝子を含有するヒト以外の哺乳動物をいう。このような動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ等が挙げられる。

以下にマウスを例として、トランスジェニック動物の典型的な作成方法を説明する。

- まず、雌マウスにPMSG（ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン）、hCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を腹腔内に注射して過排卵を誘起する。精子提供用の雄には同系統の雄マウスを用いる。培養およびウイルスとの反応は、すべて5% CO₂、95%空気、37℃の条件で行う。

- hCGの投与後16時間に、卵丘細胞に包まれた未受精卵をTYH（マウス体外受精用培地（Toyoda et al., Jpn. J. Anim. Reprod. 16, 147-151 (1971)））中に採取し、予めTYHで2時間前培養を行った精子を最終濃度が150精子/ μ Lとなるように加えて体外受精を行う。受精してから3～6時間後に受精卵をWM・EDTA（受精卵発生用培地（Hoshi et al., Jpn. J. Zootech. Sci. 56, 931-937 (1985)））に移し、ヒアルロニダーゼおよび酸性タイロイド液（pH 2.5）で卵丘細胞および卵膜を除去する。

次に、AxCANLacZ等の、外来遺伝子の導入された非増殖型アデノウイ

ルスを $10^6 \sim 10^8$ p f u / m l、好ましくは $5 \times 10^7 \sim 10^8$ p f u / m l の投与量で、該ウイルスとの反応時間を 2 ～ 8 時間としてウイルス感染を行う。
ウイルス感染後の胚を借り親マウスの子宮に移植する。

得られた産仔のゲノムに外来遺伝子の導入された非増殖型アデノウイルスが伝
5 達されたか否かを確認する。

次に、以上のようにして得られたトランスジェニックマウスと野生型のマウスとを交配して得られる子孫の F 1 において、該トランスジーンが安定に伝達され、組換え非増殖型アデノウイルス由来の外来遺伝子が発現していることを確認する。

以上のようにして得られるトランスジェニックマウスについては、以下のよう
10 な性質が観察される。

後述の実施例において示すように、3 匹のマウスすべてにおいて、1 コピーの組み込み、すなわち完全なアデノウイルス DNA が観察される (図 1)。これに反して、卵子の前核中に DNA をマイクロインジェクションした場合には、トランスジェニック動物への組み込みは、縦列の頭一尾方式で配列された多数のトランスジーンのクラスターとなって生ずる。これらの現象は、アデノウイルスの末端蛋白質が、裸の DNA 分子の場合と異なり、マウス卵子中でのウイルスゲノムの縦列形成を阻止しているのかも知れない。
15

メンデルの法則に従った安定な生殖細胞系遺伝が認められるが、この事実は、アデノウイルスゲノムの組み込みが 1 - 細胞期における DNA 合成の期間前または期間中に起こったことを示す。前核中への DNA のマイクロジェクションの場合には、1 - 細胞期の受精卵への遺伝子の組み込みが約 70 % の頻度で起こることが報告されている (Bishop et al., Mol. Biol. Med., 6, 283-298 (1989))。レトロウイルスベクターの他の場合は、分裂中の胚 (好ましくは 4 - または 8 - 細胞期) に感染するときは (Rubenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 366-368 (1986))、前ウイルス組み込み (proviral integration) が
25 1 個以上の細胞中で独立に起こり得る。従って、生殖細胞系遺伝率は、モザイク形成により (Jaenisch et al., Cell 24, 519-529 (1981))、一般的に低い。

F 1 子孫へのアデノウイルストランスジーンの遺伝の場合は、転位は一切示されない (図 3)。これに反して、ウイルス複製と宿主細胞に対する細胞毒性の誘

導を支配する E1A 遺伝子を含む野生型のアデノウイルスの場合の組み込み事象は、培養された細胞系中で多くの転位が起こるように見える (Dorsch, M. K. et al., J. Virol. 34, 305-314 (1980)、Visser, L. et al., J. Virol. 39, 684-693 (1981))。一つの可能性は、細胞毒性をもつ E1A 遺伝子の欠損により、組み込まれたアデノウイルス DNA が、マウスの 1-細胞から生殖細胞系へゲノム中で安定な状態で維持されるというものである。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

なお、実施例中のコスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作およびサザン分析は、特に断らない限り、「Molecular Cloning A Laboratory Manual. T. Maniatisら編、第 2 版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。

実施例 1

組換えアデノウイルスゲノムの卵子前核における転写および翻訳の確認

まず、卵膜の存在または非存在の状態で、前核期にある 1-細胞卵子に感染する AxCANLacZ の能力を試験した。

マウスの 1-細胞卵を卵膜を有するまま又は卵膜を除去したのち、 1×10^8 pfu/ml の AxCANLacZ (核移行シグナルを有するアデノウイルス) で感染させた。感染させた卵子を培養し、感染 24 時間後の 2-細胞期で染色した。β-ガラクトシダーゼ活性は、組織化学的 (X-Gal) 染色 (Beddington et al., Development 106, 37-46 (1989)) により検出した。

その結果、β-gal 活性は、感染卵から発育した 2-細胞胚 (ウイルス感染 24 時間後) の核中に、明確に局在していることが分かった。この結果は、組換えアデノウイルスゲノムが卵子の前核中に移行し、そして感染後 24 時間以内に転写/翻訳されることを示した。他方、卵膜の存在下では、β-gal 活性は検出されなかった。従って、卵膜の除去は、感染のための前提条件である。

実施例 2

組換えアデノウイルスゲノムの卵子ゲノムへの組み込みの確認

アデノウイルスゲノムがマウス卵子ゲノム中に組み込まれたか否かを明らかに

するために、blastocyst（培養4日後）における感染胚を借り親の子宮に移植した。27匹の生まれたマウスの尾静脈血から単離したゲノムDNAを制限酵素EcoRVおよびHindIIIで消化した。サザンブロット分析を行うと、図1に示すように、3匹のものはアデノウイルスDNAを含んでいた。2～4レーン5はそれぞれ、ウイルスの内部断片と同定された。そして、宿主ゲノムへのアデノウイルスゲノムの組み込みにより生じたウイルス-細胞DNAの連結断片と推定されたものに星印を付した。

3匹のマウス（ACL9.1、9.3および9.23）はすべて、1個のアデノウイルスゲノムを保持し、以上の分析により、アデノウイルスゲノムはマウスゲノム中10にランダムに組み込まれたことが分かった。

実験方法

マウスのゲノムDNA（10 μ g）をEcoRVまたはHindIIIで消化し、1.0%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜ハイボンド-N（アマシャム社製）上にブロットし、そしてランダムにジゴキシゲニン標識されたプローブに15ハイブリダイズさせ、サザン分析を行った。

実施例3

トランスジェニック動物中での外来遺伝子LacZの発現

さらに、本発明者らは、この3匹のトランスジェニック動物中での外来遺伝子LacZの発現を試験した。耳のパンチングにより採取した組織片を常法により20X-gal染色法（Beddington et al., Development 106, 37-46 (1989))で染色した。3匹のトランスジェニック動物のうち2匹（ACL9.3と9.23）において実際に β -gal活性が検出された。しかし他の1匹（ACL9.1）では検出されなかった。

実施例4

25 子孫F1への組換えアデノウイルスの伝達

アデノウイルスDNAが子孫F1に伝達したか否かを確かめるために、3匹のトランスジェニックマウスをICR系マウスと自然交配させた。トランスジェニックマウスの1匹（図1、ACL9.23）に由来した妊娠13.5日目の10匹のF1の胎盤から単離したゲノムDNAをHindIIIで消化した。サザン分析に

より、アデノウイルストランスジーン (transgene) は F 1 子孫 10 匹の中の 6 匹に伝達したことが分かった (図 3)。これらの断片パターン (図 3、レーン 1、3、4、7、8 および 10) は、親のトランスジェニックマウスの断片パターン (図 3、レーン A C L 9. 2 3) と一致した。他の 2 匹のトランスジェニックマウス (A C L 9. 1 および A C L 9. 3) のウイルストランスジーンも子孫 F 1 に伝達した (それぞれ、21 匹中の 11 匹および 13 匹中の 7 匹)。したがって、アデノウイルストランスジーンは、F 1 子孫に安定に遺伝することが確認されたといえる。アデノウイルストランスジーンの生殖細胞系への伝達はメンデルの法則に従っており、転位は全く認められなかった (図 3)。

10 実施例 5

アデノウイルストランスジーンの発現の確認

F 1 子孫でのアデノウイルストランスジーンの発現をさらに検討するために、同じサンプル (図 3) 由来の 10 匹の F 1 胎仔について β -g a l 活性の染色を行った。全面的かつ強烈な暗青色の染色が 10 匹の F 1 胎仔中の 6 匹で観察された。このことは、遺伝したアデノウイルストランスジーンが実際に L a c Z 遺伝子を発現したことを示すものである。対照的にアデノウイルストランスジーンを受け取らなかった他の 4 匹の胎仔は、全く染色されなかった。他のトランスジェニックマウスの系列については、A C L 9. 3 由来の 13 匹の F 1 胎仔のうちの 7 匹が β -g a l 活性を示した。以上を総合すると、これらのデータは、F 1 子孫における L a c Z 発現がアデノウイルストランスジーンの安定な状態での伝達から生じたことを明示するものである。

実験方法

胎仔全体を、Allen らの方法 (Allen, N. D. et al., Nature 333, 852-855 (1988)) の改良法により β -g a l 活性を調べるため X-g a l を用いて染色した。すなわち、胎仔を 0. 5 %ホルムアルデヒド、2. 5 %グルタルアルデヒド、および 0. 05 % NP 40 を含むリン酸緩衝液 (pH 7. 7) 中に 4 °C で 30 分間浸漬して固定した。そしてさらに 15 分間、2 回目の固定を行った。固定された胎仔をリン酸緩衝液で 3 回洗浄し、染色溶液 (5 mM フェリシアン化カリウム、5 mM フェロシアン化カリウム、0. 1 % NP 40 および 0. 5 mg /

mlのX-galを含むリン酸緩衝液)中に37℃で4時間インキュベートした。

実施例6

組み込まれたアデノウイルストランスジーンは1コピーであることの確認

3匹のマウスすべてにおいて、1コピーの組み込み、すなわち完全なアデノウイルスDNAが観察された(図1)。これに反して、卵子の前核中にDNAをマイクロインジェクションした場合には、トランスジェニック動物への組み込みは、縦列の頭一尾方式で配列された多数のトランスジーンのクラスターとなって生ずる。これらの現象は、アデノウイルスの末端蛋白質が、裸のDNA分子の場合と異なり、マウス卵子中でのウイルスゲノムの縦列形成を阻止しているのかも知れない。

実施例7

組み込み効率に対するウイルス投与の影響

受精卵の卵丘細胞および卵膜を除去した後、表1に記載の投与量でAxCANLacZを感染させ、インビトロでblastocystまで培養した後、借り親の子宮に戻した。実際、 1×10^7 、 5×10^7 および 1×10^8 (pfu/ml) で感染した胚を移植し、それぞれ55、32、および36匹の動物個体が得られた。これらの個体について、LacZ遺伝子をプローブとするサザンブロット解析により得られた結果を表1に示す。表1から明らかなように、ウイルスの投与量が 1×10^7 pfu/mlの場合(2/55)に比べて、 5×10^7 pfu/mlの場合(4/32)および 1×10^8 pfu/mlの場合(4/36)は、組み込み効率が飛躍的に向上することが分かる。これは、通常のウイルス感染の場合と異なりウイルス投与量の増加による動物細胞の死滅を考慮する必要がないため、ウイルス投与量の高い方が効率が向上するという結果が得られたものと思われる。

表1：ウイルス投与量の組み込み効率に対する影響

ウイルス投与量 (pfu /ml)	組み込み効率 (%)
0 (対照)	ND
1×10^7	2 / 55 (3.6)
5×10^7	4 / 32 (12.5)
1×10^8	4 / 36 (10.3)
合 計	10 / 123 (8.1)

ND：未測定

10 産業上の利用可能性

本発明の方法によって簡便かつ効率的にトランスジェニック動物を作成することができる。

請求の範囲

1. 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させた後、この胚を借り親動物の子宮に移植することを特徴とする
- 5 るトランスジェニック動物の作成方法。
2. 外来遺伝子が、生理活性タンパク、抗体、マーカー遺伝子としての発色タンパクまたはマーカー遺伝子としての薬剤耐性タンパクをコードする塩基配列を有するヌクレオチドである請求の範囲1記載のトランスジェニック動物の作成方法。
- 10 3. 非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させる場合の投与量が $5 \times 10^7 \sim 10^8$ pfu/mlであることを特徴とする請求の範囲1または2記載のトランスジェニック動物の作成方法。
4. 非増殖型組換えアデノウイルスが、CAGプロモーター支配下に発現するものである請求の範囲1～3のいずれかに記載のトランスジェニック動物の作成
- 15 方法。
5. 非増殖型組換えアデノウイルスが、核移行シグナルを含むものである請求の範囲1～4のいずれかに記載のトランスジェニック動物の作成方法。
6. 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスの1コピーだけが動物受精卵のゲノムに組み込まれることを特徴とする請求の範囲1～5のいずれか
- 20 に記載のトランスジェニック動物の作成方法。
7. 外来遺伝子を導入した非増殖型組換えアデノウイルスを卵膜を除去した動物受精卵に感染させた後、この胚を借り親動物の子宮に移植することによって作成されたトランスジェニック動物。

1/2

FIG.1

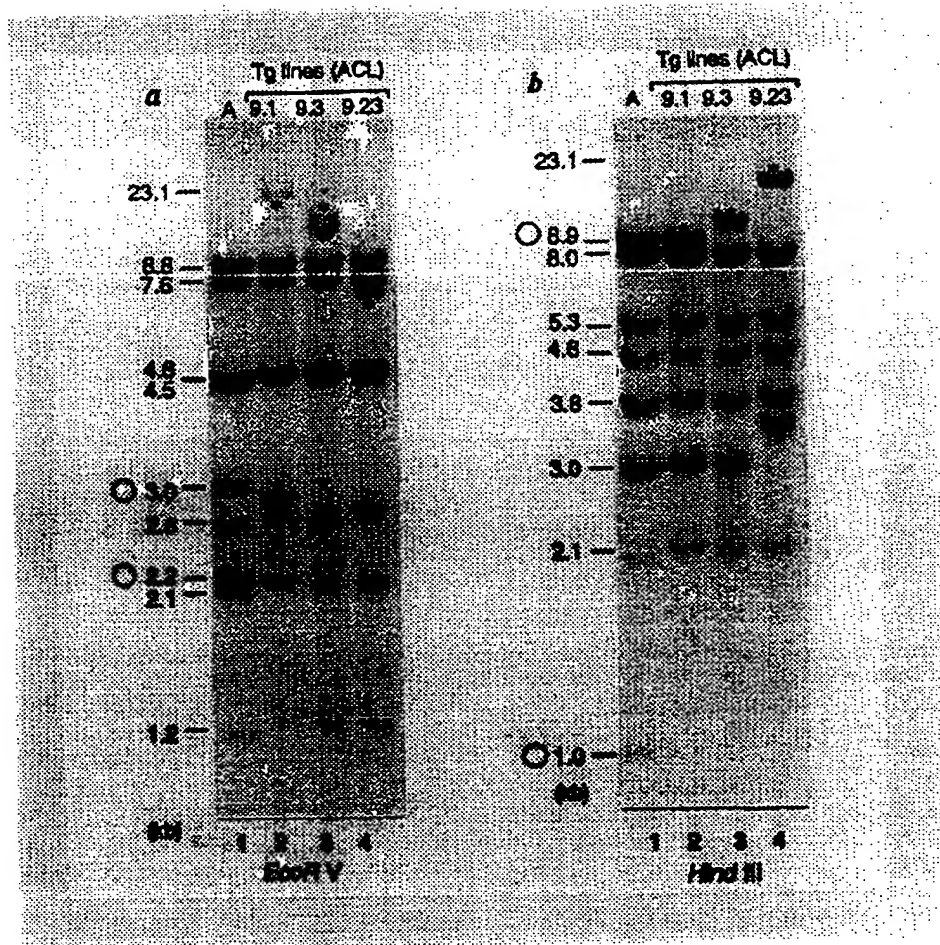
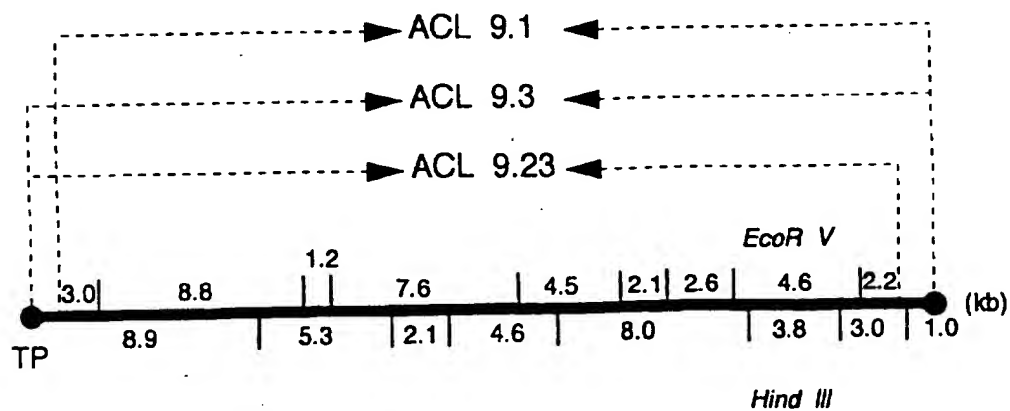
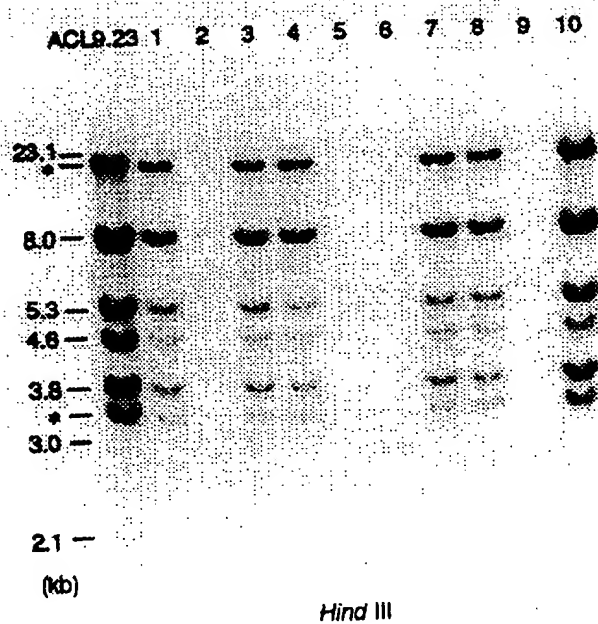


FIG.2



差替え用紙 (規則26)

FIG.3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Tsukui et al., Mol. Reprod. Dev. 42, p. 291-297 (1995)	1-3, 6, 7 4, 5
X Y	Tsukui et al., J. Mamm. Ova. Res. 10(1), p. 150-151 (1993)	1-3, 6, 7 4, 5
Y	Arai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, p. 160-164 (1995)	4
Y	Daniel Kalderon et al., Cell 39, p. 499-509 (1984)	5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 24, 1997 (24. 01. 97)

Date of mailing of the international search report

February 4, 1997 (04. 02. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Tsukui et al., Mol. Reprod. Dev. 42, p. 291-297 (1995)	1-3, 6, 7 4, 5
X Y	Tsukui et al., J. Mamm. Ova. Res. 10(1), p. 150-151 (1993)	1-3, 6, 7 4, 5
Y	Arai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, p. 160-164 (1995)	4
Y	Daniel Kalderon et al., Cell 39, p. 499-509 (1984)	5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 01. 97

国際調査報告の発送日

04.02.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

印

2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236